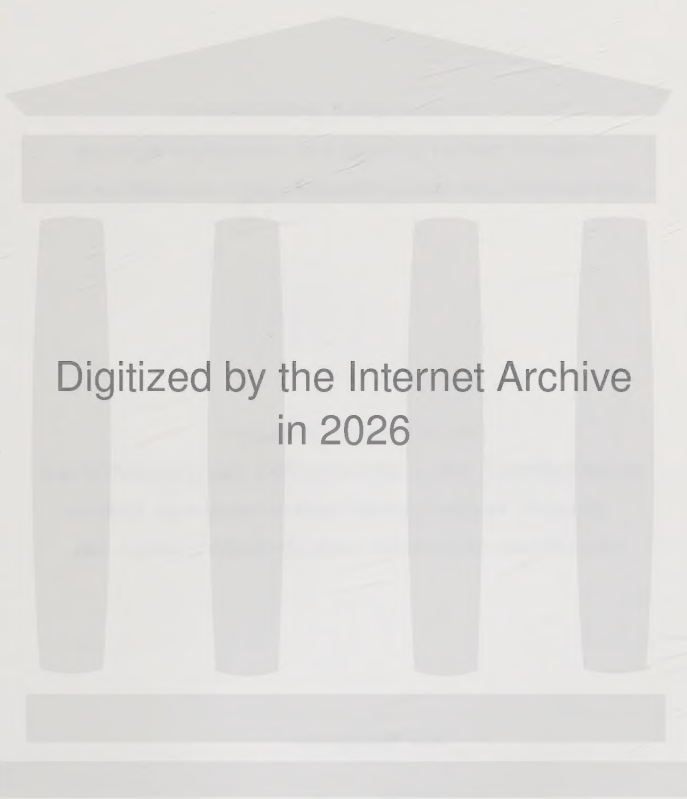


INTRAZELLULÄRE LOKALISATION
GLYCOGENOLYTISCHER UND GLYCOLYTISCHER
ENZYME IM WEISSEN UND ROTEN SKELETT-
MUSKEL DES KANINCHENS

PETER SIGEL

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548322_0040

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Ludwig Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Intrazelluläre Lokalisation
glycogenolytischer und glycolytischer Enzyme
im weißen und roten Skelettmuskel des Kaninchens



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Sigel

aus

München

München 1970



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Pette
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher
Dekan:	Prof. Dr. E. Kraft
Tag der mündlichen Prüfung:	20. 1. 1970

meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Morphologische Strukturen als mögliche Enzymwirkorte	1
2. Lokalisationshinweise aufgrund quantitativer biochemischer Untersuchungsmethoden	2
3. Histochemisch lokalisierte Enzyme	3
4. Problemstellung	3

Methodik

1. Tiermaterial	5
2. Gewebematerial	5
3. Muskelpräparation	5
4. Herstellung der Gewebeschnitte	5
5. Chemikalien und Biochemikalien	6
6. Herstellung der Gelfilme	7
7. Testreaktionen und Zusammensetzung der Reaktionsgele	8
8. Färbeverfahren	13

Ergebnisse

1. Kontrollversuche	14
2. Spezifische Reaktionen	14
a) Phosphorylase	14
b) Phosphoglucomutase	16
c) Hexokinase	17
d) Glucosephosphat-Isomerase	18
e) Phosphofructokinase	19
f) Aldolase	20
g) Triosephosphat-Isomerase	22

Diskussion

1. Zusammengesetzte Enzymreaktionen im Gelschicht-	23
verfahren	
2. Beurteilung artefizieller Formazanablagerungen	24
3. Aussagekraft der Ergebnisse	25
a) Lokalisation der Hexokinase	25
b) Im I-Band lokalisierte Enzyme	27
4. Schlußbemerkung	30

Zusammenfassung	31
-----------------	----

Literaturverzeichnis	33
----------------------	----

Die Enzyme der Glycogenolyse und Glycolyse sind im Muskel Teil des sogenannten löslichen Zellproteins. Es steht weiterhin fest, daß diese "löslichen" Enzyme im extramitochondrialen Teil des Sarkoplasmas lokalisiert sind (5,17,18,19,41,43,46,48,56). Mit dieser mehr oder weniger negativ definierten Lokalisation bleibt aber unklar, ob die glycolytischen Enzyme gleichmäßig im extramitochondrialen Sarkoplasma verteilt sind, oder ob sie sich in einem besonderen Areal oder Kompartiment des extramitochondrialen Raumes finden. Morphologisch lassen sich jedenfalls definierte und verschiedene Räume oder Strukturen des extramitochondrialen Sarkoplasmas, wie etwa das periphere, dem Sarkolemm unterlagerte Sarkoplasma, das interfibrilläre und das interfilamentäre Sarkoplasma, voneinander abgrenzen. Möglicherweise haben sie im Hinblick auf die Lokalisation des extramitochondrialen energieliefernden Stoffwechselsystems eine unterschiedliche Bedeutung. Ein weiteres und abgeschlossenes Kompartiment, das durchaus als Ort der Glycolyse in Betracht gezogen werden kann, ist das sarkoplasmatische Retikulum. Andere Lokalisationsvarianten könnten in einer Verbindung zwischen den Enzymen der Glycolyse und Glycogenolyse und den Strukturen des Sarkoplasmas, wie Myofilamente, Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums, äußere Mitochondrienmembran und der Oberfläche der Zellinnenwand bestehen.

Die glycolytischen Enzyme werden wegen ihrer relativ leichten Extrahierbarkeit als "lösliche" Enzyme bezeichnet. Mehr kann diese Bezeichnung nicht aussagen, weil sie sich allein auf das Extraktionsverhalten bezieht. Tatsächlich liegen "lösliche" Enzyme keineswegs nur in Lösung oder in der löslichen Phase (5) des extramitochondrialen Sarkoplasmas vor. Biochemische Untersuchungen haben mit Hilfe der Zellfraktionierung gezeigt, daß bestimmte extramitochondriale Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels nicht

statistisch verteilt sind oder in einer löslichen Phase innerhalb des Sarkoplasmas vorliegen. So besteht für die Phosphorylase (EC 2.4.1.1) eine Bindung an Glycogen (32), Glycogensynthetase (EC 2.4.1.11) ist mit dem sarkotubulären System verknüpft (35). Im Fall der Hexokinase (EC 2.7.1.1) konnte bewiesen werden, daß ein Teil der Enzymaktivität an die äußere Mitochondrienmembran gebunden ist (27,30,49). Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) konnte in zwei verschiedenen, von der Ionenstärke des Extraktionsmediums abhängigen Fraktionen aus dem Muskel extrahiert werden (26,29,48,47). Experimentelle Daten verschiedener Autoren (34,35,37) legen nahe, daß die Phosphofructokinase mit dem sarkotubulären System in Verbindung steht. Es gelang ferner zu zeigen, daß die Phosphofructokinase reversibel an das kontraktile Protein, insbesondere an F-Aktin gebunden werden kann (8,9,43). Eine analoge Verbindung mit Strukturproteinen des Muskels konnte für die Aldolase (Fructose-1.6-diphosphat-Aldolase, EC 4.1.2.7) und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) nachgewiesen werden. Beide Enzyme zeigen ein der Phosphofructokinase ähnliches Extraktionsverhalten und können in hoher Quantität reversibel an F-Aktin gebunden werden (7,8,9,43). Diese Ergebnisse kann man als Erklärung für die kürzlich beschriebene Bindung der Aldolase an Partikel in Muskelhomogenaten (52) werten. Ein weiterer Beweis für eine Verbindung der glycolytischen Enzyme mit Strukturproteinen des Muskels ergibt sich aus den elektrophoretisch dargestellten Komplexen zwischen Aldolase, Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) und verschiedenen Strukturproteinen (2,3,4,10).

Einen unmittelbaren Beweis für eine ungleichförmige Verteilung der glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme in der Muskelzelle geben histochemische Untersuchungsmethoden. Der histochemische Nachweis der Phosphorylase im Muskel läßt die Enzymaktivität überwiegend innerhalb der isotropen Zone erkennen (53). Somit stimmen: intrazeiluläre Verteilung von Phosphorylase und Glycogen überein (21,50). Am Insektenmuskel wurden Lokalisationsstudien unter Verwendung von fluoreszierendem Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Antiserum durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse deuten an, daß die Enzymaktivität auf die I-Band Mitochondrien beschränkt ist (20). Eine deutliche Färbung der isotropen Zonen der Insekten- und Säugermuskulatur konnte erzielt werden, als die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und der Lactat-Dehydrogenase histochemisch im Gelschicht-Verfahren dargestellt wurde (12,13,44,48). Die Farbablagerungen am Ort der isotropen Zone wurden als Hinweis auf die Lokalisation dieser beiden Enzyme innerhalb des interfilamentären Sarkoplasmas der I - Bänder interpretiert. Entsprechende Färbemuster wurden beim Nachweis der Lactat-Dehydrogenase im längsgeschnittenen Muskel auch von anderen Autoren beschrieben. Aus Untersuchungsergebnissen querschnittener Muskelpräparate wurde allerdings auch eine Lokalisation des Enzyms im transversalen sarkotubulären System abgeleitet (23,24).

Eine präzise Antwort auf die Frage nach der intrazellulären Lokalisation der glycolytischen Enzyme im quergestreiften Muskel steht offensichtlich noch aus. Nur einzelne Enzyme wurden direkten histochemischen Lokalisationsstudien unterzogen, und diese führten, soweit in der Literatur darüber berichtet wurde, in einzelnen Fällen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die vorliegende Studie stellt sich zur Aufgabe, die Verteilung der glycolytischen Enzyme inner-

halb des extramitochondrialen Sarkoplasmas neu zu bestimmen. Hierzu wurden Methoden zur histochemischen Darstellung der Phosphorylase, Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1), Hexokinase, Glucosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9), Phosphofructokinase, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1) ausgearbeitet. Die Methode baut auf den Grundsätzen des Gelschicht-Verfahrens auf, das ursprünglich nur zur spezifisch histochemischen Darstellung der NAD- und NADP- abhängigen Dehydrogenasen entwickelt wurde (13,23,44,45). Es wird gezeigt werden, daß das Gelschicht-Verfahren gleichermaßen für die histochemische Darstellung der oben genannten Enzyme anwendbar ist, indem ihre Reaktion direkt oder indirekt über Hilfsenzyme an eine NAD- oder NADP- abhängige Dehydrogenase gekoppelt wird.

Methodik

Tiermaterial

Für die Versuche wurden erwachsene Kaninchen der Rasse "Deutsche Widder" verwendet. Die Tiere wurden mit einer Standard-Diät (Altromin K, Altromin GmbH., Lage) ernährt. Nach zwölfstündigem Fasten wurden sie durch Genickschlag und Entbluten getötet.

Gewebematerial

Als typisch weißer oder tetanischer Muskel wurde der M. psoas gewählt, als typisch roter oder tonischer Muskel der M. semitendineus. Beide Muskeln zeichnen sich durch charakteristische Unterschiede in den Aktivitätsniveaus der Enzyme der Glycogenolyse, Glycolyse und der Atmungskette aus (2,16,17,37,41,42,43,46,57).

Präparation

Die betreffenden Muskeln wurden freipräpariert und bei leichter Dehnung durch Übergießen mit in flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan in situ eingefroren. Erst dann wurden sie in Ursprung und Ansatz durchtrennt und bei -65°C aufbewahrt.

Herstellung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden mit Wasser auf den mit CO_2 gekühlten Objekttisch des Mikrotoms festgefroren. In einem Kryostat, System Dittes-Duspiva (W. Ditters, Heidelberg) wurden Quer- und Längsschnitte in einer Dicke von 3-5 μ hergestellt. Die Gewebe-

schnitte wurden durch Wärmekontakt auf Deckgläsern (15 x 15 mm) fixiert und mehrere Minuten bei Zimmertemperatur getrocknet. Zur histochemischen Färbung wurden die auf Deckgläsern fixierten Gewebeschnitte unmittelbar mit dem Gelfilm in Kontakt gebracht. Nur im Fall der Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1) wurde ein flüssiges Färbemedium verwendet. Hierzu wurden die Deckgläser zur Inkubation in einen speziellen Mikro-Färbebecher (B. Braun, Melsungen) gebracht.

Chemikalien und Biochemikalien

Alle chemischen und biochemischen Substanzen wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit verwendet. Die Lösungen wurden in quartzdestilliertem Wasser bereitet. Im einzelnen wurden die Substanzen von folgenden Firmen bezogen:

E. Merck, Darmstadt

Na_2HAsO_4 , Na_2HPO_4 , KCN, MgCl_2 , EDTA, D-(+)-Glucose

Behringwerke AG., Marburg

Agarose, Rinderserumalbumin

Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Phenazinmethosulfat (PMS)

Dajac Laboratory, The Borden Co., Philadelphia, USA

Nitro Blue-Tetrazolium

Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, USA

Glycogen aus Kaninchenleber

C.F. Boehringer und Söhne GmbH., Mannheim

Triäthanolamin-Hydrochlorid (TRA), Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP), Fructose-6-phosphat di-Natriumsalz (Fru-6-P),

Fructose-1,6-diphosphat kristall. tetra-Cyclohexylammoniumsalz (Fru-1.6-P₂), Natriumsuccinat, Dihydroxyacetonphosphat-dimethylketal kristall. tetra-Cyclohexylammoniumsalz (DAP), Glucose-1-phosphat kristall. di-Kaliumsalz synthetisch (Glc-1-P), Glucose-1,6-diphosphat kristall. tetra-Cyclohexylammoniumsalz (Glc-1.6-P₂), Adenosin-5'-monophosphat kristall. di-Natriumsalz (5'-AMP), Adenosin-5'-triphosphat kristall. di-Natriumsalz (ATP), kristalline Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49), kristalline Aldolase, kristalline Triosephosphat-Isomerase, kristalline Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Dihydroxyacetonphosphat wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers aus der Dimethylketal-Cyclohexylammoniumbindung gelöst. Die Hilfsenzyme wurden vor Verwendung in der histochemischen Färbereaktion von (NH₄)₂SO₄ befreit. Hierzu wurde die Enzymsuspension zentrifugiert, das sedimentierte Protein in quartzdestilliertem Wasser gelöst und mit Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemical, Upsala, Schweden) behandelt. Die Aktivität der Hilfsenzyme wurde regelmäßig in optischen Tests kontrolliert (15). Ebenso wurden die Konzentrationen der meisten Substrate und Co-substrate (NAD, NADP, 5'-AMP, ATP, Glucose, Glc-1-P, Glc-1.6-P₂, Fru-6-P, Fru-1.6-P₂, DAP) in ihren Stammlösungen mit enzymatisch-optischen Testmethoden gemessen (11,22).

Herstellung der Gelfilme

Eine 4% Lösung von Agarose in quartzdestilliertem Wasser wurde 30 Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt, anschließend

in einem thermostatisierten Wasserbad auf 42°C abgekühlt und auf dieser Temperaturhöhe stabilisiert. Gleiche Volumina der Agaroselösung und des Reaktionsmediums, das die Substrate, Co-substrate, Hilfsenzyme, Farbstoff etc. in der zweifachen im Reaktionsgel vorliegenden Endkonzentration enthielt, wurden nun schnell miteinander vermischt. Mit einer Pipette konnte das flüssige Reaktionsgel auf Glasplättchen getropft werden, die auf einer horizontalen thermostatisierten (42°C) Metallplatte lagen. Die Tropfen wurden mit Silikon überzogenen Glasplättchen abgedeckt, wobei zur Abstandhaltung 0,2 mm starker Stahldraht an zwei gegenüberliegenden Seiten des Geltropfens verwendet wurde. Durch aufgelegte Gewichte von ca. 5 g konnten so Filme von 0,2 mm Dicke geformt werden. Sobald kaltes Wasser durch die Kühlschläge des Metalltisches geleitet wurde, erstarrten die Filme fast augenblicklich. Die fertigen Reaktionsfilme konnten gebrauchsfertig mehrere Stunden bei 4°C in einer feuchten und abgedunkelten Kammer aufbewahrt werden.

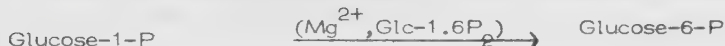
Testreaktionen und Zusammensetzung der Reaktionsgele

In diesem Abschnitt sind die Test- und Hilfsreaktionen schematisch beschrieben und die Zusammensetzung der Reaktionsgele angegeben. Die Konzentrationen beziehen sich auf die gebrauchsfertigen Gelfilme.

a) Phosphorylase (EC 2.4.1.1)



Hilfsenzyme: Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase



Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5 mg/ml, TRA: 50 mM,
 EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, MgCl_2 : 10 mM, Na_2HPO_4 : 10 mM,
 Glycogen: 0,5 mg/ml, 5'-AMP: 2 mM, Glc-1.6-P₂: 0,1 mM,
 NADP: 1,0 mM, PMS: 0,2 mM, Nitro-BT: 1,4 mM,
 Phosphoglucomutase: 10 U/ml, Glucose-6-phosphat-
 Dehydrogenase: 15 U/ml. pH 7,6

b) Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1)

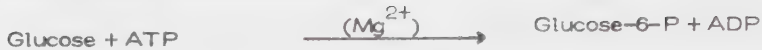


Hilfsenzym: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase



Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5mg/ml, TRA: 50 mM,
 EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, MgCl_2 : 10 mM, Glc-1-P: 10 mM,
 Glc-1.6-P₂: 0,1 mM, NADP: 1,0 mM, PMS: 0,2 mM,
 Nitro-BT: 1,4 mM, Glucose-6-phosphat-Dehydroge-
 nase: 15 U/ml. pH 7,6

c) Hexokinase (EC 2.7.1.1)



Hilfsenzzym: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase



Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5 mg/ml, TRA: 50 mM,
EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, Na_2HPO_4 : 5 mM, MgCl_2 : 16 mM,
Glucose: 5 mM, ATP: 12 mM, NADP: 1 mM, PMS: 0,2 mM,
Nitro-BT: 1,4 mM, Glucose-6-phosphat-Dehydro-
genase: 15 U/ml. pH 7,6

d) Glucosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9)

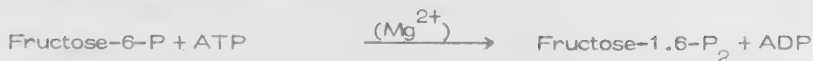


Hilfsenzzym: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase



Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5 mg/ml, TRA: 50 mM,
EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, Fru-6-P: 10 mM, NADP: 1 mM,
PMS: 0,2 mM, Nitro-BT: 1,4 mM, Glucose-6-phosphat-
Dehydrogenase: 15 U/ml. pH 7,6

e) Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11)



Hilfsenzyme: Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase



Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5 mg/ml, TRA: 50 mM,
EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, Na_2HAsO_4 : 3 mM, MgCl_2 : 8 mM,
Fru-6-P: 10 mM, ATP: 2 mM, NAD: 1,5 mM, PMS: 0,2 mM,
Nitro-BT: 1,4 mM, Aldolase: 10 U/ml, Triosephosphat-
Isomerase: 50 U/ml, Glycerinaldehydphosphat-
Dehydrogenase: 20 U/ml. pH 8,0

f) Aldolase (EC 4.1.2.7)



Hilfsenzyme: Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase



Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5 mg/ml, TRA: 50 mM,
EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, Na_2HAsO_4 : 3 mM,
 Fru-1.6-P_2 : 10 mM, NAD: 1,5 mM, PMS: 0,2 mM,
Nitro-BT: 1,4 mM, Triosephosphat-Isomerase: 50 U/ml,
Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase: 20 U/ml.
pH 7,6.

g) Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1)

Dihydroxyaceton-P $\longrightarrow$ Glycerinaldehyd-P

Hilfsenzym: Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

Glycerinaldehyd-P + NAD + H_2O $\longrightarrow$ Glycerat-3-P + NADH_2

NADH_2 + PMS $\longrightarrow$ NAD + PMSH_2

PMSH_2 + Tetrazolium $\longrightarrow$ PMS + Formazan

Reaktionsgel: Agarose: 2%, Albumin: 5 mg/ml, TRA: 50 mM,
EDTA: 5 mM, KCN: 1 mM, Na_2HAsO_4 : 3 mM,
Dihydroxyaceton-P: 5 mM, NAD: 1,5mM, PMS:0,2 mM,
Nitro-BT: 1,4 mM, Glycerinaldehydphosphat-
Dehydrogenase: 20 U/ml. pH 7,6

h) Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.9.9.1)

Anfärbung gemäß 41.

Färbeverfahren

Nach dem Abheben eines der beiden Glasplättchen wurde das den Gelfilm tragende Glas auf eine thermoregulierte Metallplatte gelegt (30°C). Nach einigen Minuten war der oberflächliche Flüssigkeitsfilm abgetrocknet und der Gewebeschnitt konnte auf den Gelfilm gelegt werden. Die Inkubation erfolgte einige Minuten in einer dunklen und feuchten Kammer in Stickstoffatmosphäre. Sobald sich eine genügende Farbintensität entwickelt hatte, wurde das Deckgläschen mit dem anhaftenden gefärbten Gewebeschnitt abgehoben, in destilliertem Wasser gespült, 60 Minuten in einer 4% Formaldehydlösung fixiert und in Glyceringelatine eingebettet.

Ergebnisse

Kontrollversuche

Die Spezifität der Methode wurde auf zweierlei Art überprüft: In einer ersten Versuchsserie wurden die Reaktionsgele mit reinen Enzymen getestet. Eine Färbung konnte nur beobachtet werden, wenn dem spezifischen Reaktionsgel jeweils das nachzuweisende Enzym zugeführt wurde. Das Fehlen eines Substrates oder eines anderen Reaktionspartners ergab negative Befunde. In einer zweiten Versuchsserie wurden jeweils parallel zu den spezifischen Färbungen substratfreie Reaktionsgele geprüft. Mit einer einzigen Ausnahme, nämlich im Fall der Phosphorylase, führte die Inkubation von Muskelschnitten mit substratfreien Reaktionsgelen zu keiner signifikanten Färbung. Eine geringfügige Blindreaktion, die in Abwesenheit von Substrat immer beobachtet werden kann, rührt sicherlich von der Oxydation endogener Substrate her. Ebenso kann endogenes NADH_2 und NADPH_2 zu einer unspezifischen Formazanablagerung Anlaß geben. Diese beobachteten Blindreaktionen konnten jedoch mit Sicherheit als unbedeutend bewertet werden, da sie in keinem Fall die typischen Färbebilder zu stören vermochten, die sich aus den Enzymreaktionen im vollständigen Reaktionssystem ergaben.

Spezifische Reaktionen

a) Phosphorylase

Abb. 1 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der histochemisch nachgewiesenen Phosphorylaseaktivität im Längsschnitt des M.psoas.

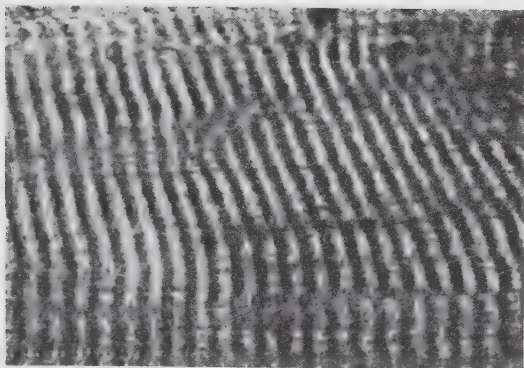


Abb. 1. Aktivitätsnachweis der Phosphorylase in einem Längsschnitt des *M. psoas*. Vergr.: 1600 x

Es ist deutlich erkennbar, daß nur bestimmte Bereiche des Sarkomers angefärbt sind. Die Übereinstimmung dieses Färbemusters mit dem typischen Querstreifungsbild des Muskels zeigt die Betrachtung im polarisierten Licht. Qualitativ gleiche Ergebnisse erbringt auch die Inkubation auf glycogenfreien Reaktionsgelen. In diesem Fall kann ebenso eine Farbiagerung im Bild einer Querstreifung beobachtet werden, wenngleich die Intensität der Färbung doch deutlich geringer ist als in Gegenwart von Glycogen. Aus diesem Befund kann gefolgert werden, daß die Konzentration des endogenen Glycogens hoch genug ist, um auch ohne zugeführtes Glycogen (d.h. im substratfreien Gel) eine positive Reaktion zu verursachen. Die Vermutung liegt nahe, daß somit die Gelschichttechnik auch für die histochemische Darstellung des Glycogens verwendet werden könnte. Bei diesem Versuch müßte dann natürlich Phosphorylase in einem glycogenfreien Reaktionsgel enthalten sein. Offensichtlich ist die intrazelluläre Lokalisation

der Phosphorylase im Muskel identisch mit der des Glycogens, denn nur so kann die histochemische Darstellung der Phosphorylase sowohl in Anwesenheit wie in Abwesenheit von Glycogen im Gelfilm zu qualitativ gleichen Ergebnissen führen.

b) Phosphoglucomutase

Der Nachweis der Phosphoglucomutase-Aktivität in einer einzelnen Faser des M.psoas ist in Abb. 2 gezeigt. Die Farblagerung stimmt mit der in Abb. 1 gezeigten überein. Das Färbemuster kann als eine regelmäßige Querstreifung senkrecht zur Verlaufsrichtung der Myofibrillen beschrieben werden. Regelmäßig und ohne Unterschied führt die Phosphoglucomutase-Reaktion im weißen (M.psoas) und im roten (M.semitendineus) Muskel zur Anfärbung definierter Sarkomerabschnitte.

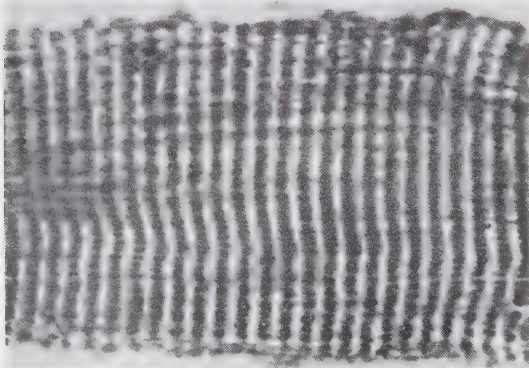


Abb. 2 Aktivitätsnachweis der Phosphoglucomutase in einem Längsschnitt des M.psoas. Vergr.: 1600 x.

3



4

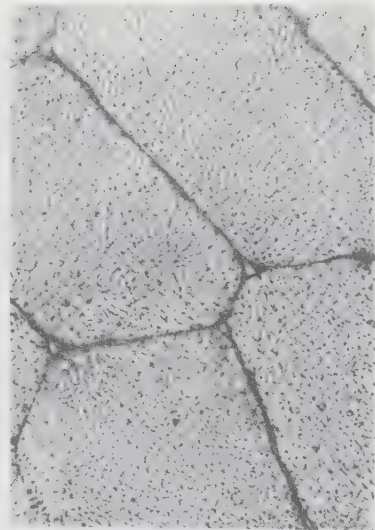


Abb. 3. Aktivitätsnachweis der Hexokinase in einem Längsschnitt des *M.semitendineus*. Vergr.: 1400 x.

Abb. 4. Aktivitätsnachweis der Hexokinase in einem Querschnitt des *M.semitendineus*. Vergr.: 480 x.

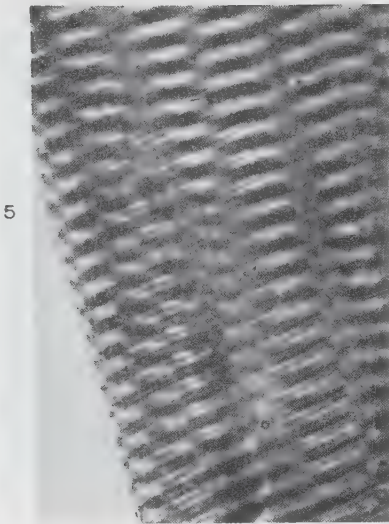
c) Hexokinase

Das Aktivitätsniveau der Hexokinase ist im roten Muskel deutlich höher als im weißen (16,42,43). Entsprechend führt der histochemische Nachweis im *M.semitendineus* zu einer viel intensiveren Anfärbung als im *M.psoas*. In Abb. 3 und Abb. 4 sind die für die Hexokinase-Aktivität spezifischen Reaktionen in einem Längsschnitt (Abb. 3) und in einem Querschnitt (Abb. 4) des *M. semitendineus* dargestellt. Im Längsschnitt unterscheidet sich die Farbverteilung deutlich von den Färbemustern wie sie für Phosphorylase (Abb. 1),

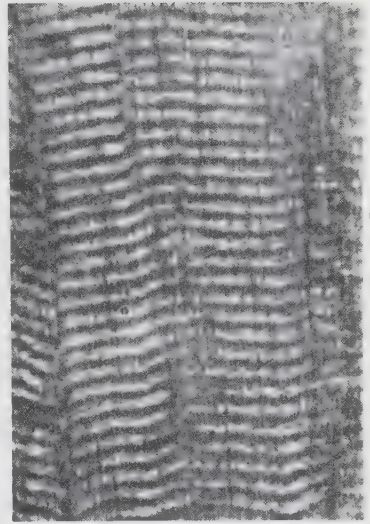
Phosphoglucomutase (Abb. 2), Glucosephosphat-Isomerase (Abb.5) und alle anderen, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzyme nachgewiesen wurden. Im Fall der Hexokinase sind nur selten typische Querstreifungsmuster zu beobachten. Das Formazan ist meistens entlang den Myofibrillen abgelagert (Abb. 3). Die Färbung zeigt schmale, längsgerichtete Reihen von Tröpfchen bzw. Banden unregelmäßiger Form. Im Querschnitt, wie ihn Abb. 4 zeigt, ist das Färbemuster eher noch unregelmäßiger, wenn auch eine netzartige Struktur erkennbar ist. Auffallend ist die dichte Anfärbung des Sarkolemm und des subsarkolemmalen Raumes sowie die hohe Formazankonzentration in einigen Bereichen nahe dem Sarkolemm.

d) Glucosephosphat-Isomerase

Die spezifische Reaktion für die Glucosephosphat-Isomerase wird in Abb. 5 gezeigt. Hier ist das typische Färbemuster am längsgeschnittenen M.psoas. abgebildet, es läßt sich jedoch ebenso im roten Muskel (M.semitendineus) darstellen. Aus der Anfärbung bestimmter Sarkomerabschnitte ergibt sich wiederum ein regelmäßiger Wechsel von gefärbten und ungefärbten Banden. Es besteht Übereinstimmung mit der schon für die Phosphorylase und Phosphoglucomutase beschriebenen Verteilung.



5



6

Abb. 5. Aktivitätsnachweis der Glucosephosphat-Isomerase in einem Längsschnitt des *M. psoas*. Vergr.: 1600 x.

Abb. 6. Nachweis der Phosphofructokinase-Aktivität in einem Längsschnitt des *M. psoas*. Vergr.: 1400 x.

e) Phosphofructokinase

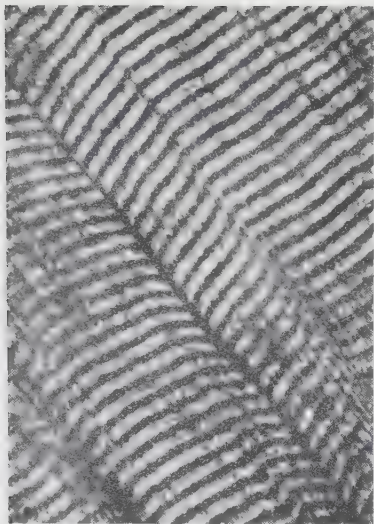
Der histochemische Nachweis der Phosphofructokinase ist erschwert durch den hemmenden Einfluß hoher ATP-Konzentrationen auf die Enzymaktivität (33,38,55). Andererseits sind gerade in der Enzymhistochemie reaktiv hohe Konzentrationen an Substraten und Cosubstraten notwendig, um positive Reaktionen zu erhalten. Bei dem Phosphofructokinase-Nachweis konnte deshalb – verursacht durch die hohe ATP-Konzentration im Reaktionsgel und die damit verbundene Hemmung des Enzyms – bei einem pH von 7,6 keine Enzymaktivität im Muskel histochemisch nachgewiesen werden.

Da der hemmende Effekt des ATP in mehr alkalischem Milieu nicht zu beobachten ist, wurde das Reaktionsgel auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Die Zugabe positiver Effektoren ($5'$ -AMP, P_{anorg} , NH_4) zum Reaktionsgel blieb ohne Wirkung auf die Qualität der histochemischen Reaktion, es wurden daher im endgültigen Reaktionsgel keine dieser Effektoren verwendet. Eine weitere Schwierigkeit für die histochemische Darstellung der Phosphofructokinase ist in der Koppelung vier aufeinanderfolgender Enzymreaktionen zu sehen. Dennoch gelingt der Nachweis der Phosphofructokinase im weißen und roten Muskel. Die Abb. 6 zeigt das kennzeichnende Ergebnis in einem Längsschnitt des M.psoas. Die Formazanablagerungen finden sich in bandförmigen Mustern, die in der Anfärbung bestimmter Sarkomerabschnitte dem Bild der Querstreifung entsprechen.

7) Aldolase

Abb. 7 zeigt die Verteilung der Aldolase-Aktivität in einem Längsschnitt des M.psoas. Die Abbildung weist auf ein typisches Querstreifungsmuster, das der charakteristischen Farbstoffverteilung im Fall der Phosphorylase, Phosphoglucumutase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase oder Triosephosphat-Isomerase entspricht. Ebenfalls nicht nur für die Aldolase kennzeichnend ist die Färbung des quergeschnittenen Muskels (Abb. 8). Beim histochemischen Nachweis der Phosphorylase, Phosphoglucumutase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase und Triosephosphat-Isomerase ergeben sich identische Resultate. In allen Fällen führt die Färbung im quergeschnittenen Muskel zu netzartigen Formazanablagerungen innerhalb der einzelnen Fibrillen.

7



8

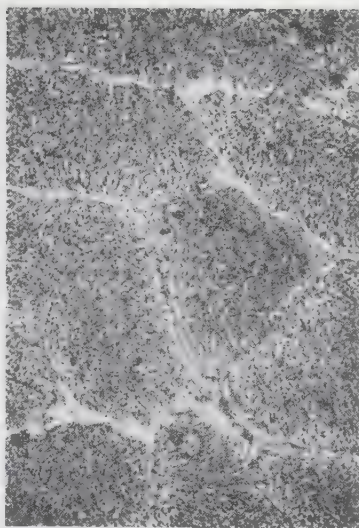


Abb. 7. Aktivitätsnachweis der Aldolase in einem Längsschnitt des M.psoas. Vergr.: 1400 x.

Abb. 8. Aktivitätsnachweis der Aldolase in einem Querschnitt des M. psoas. Vergr.: 560 x

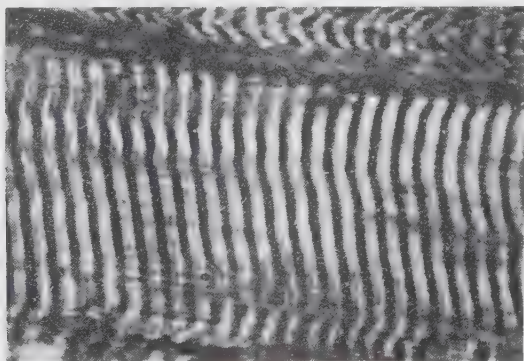


Abb. 9. Nachweis der Triosephosphat-Isomerase in einem Längsschnitt des M.psoas. Vergr.: 1600 x.

g) Triosephosphat-Isomerase

Die intrazelluläre Verteilung dieses Enzyms (Abb. 9) stimmt mit den Bildern des histochemischen Nachweises der Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase und Aldolase überein. Das deutliche Querstreifungsmuster läßt sich im weißen und roten Muskel finden. Die Formazanablagerungen erscheinen in regelmäßigen Banden, die bestimmten Abschnitten des Sarkomers entsprechen.

Diskussion

Ursprünglich wurde das Gelschicht-Verfahren zur histochemischen Lokalisation NAD- und NADP-abhängiger Dehydrogenasen ausgearbeitet (12,13,23,44,45). Die Resultate, die histochemische Aktivitätsnachweise von Dehydrogenasen mit der konventionellen Methode ergaben, waren abhängig von der Verteilung einer Pyridinnucleotid-abhängigen Tetrazolium-Reduktase (13,23,24,25,28,36,40,45, 57). Die Gelfilm-Technik ist von der Verteilung endogener Tetrazolium-Reduktasen unabhängig. Sie erlaubt deshalb den histochemischen Nachweis NAD- und NADP-abhängiger Dehydrogenasen direkt am Ort ihrer Wirkung. Nun erschien es interessant, diese Methode auch auf zusammengesetzte Enzymreaktionen auszudehnen und damit Enzyme zu erfassen, die nicht der Klasse der Oxydoreduktasen angehören. Zusammengesetzte Enzymreaktionen wurden schon früher für den histochemischen Nachweis der Aldolase herangezogen, allerdings mit anderen Methoden als dem Gelschicht-Verfahren (1,6,51,54). Die gegenwärtige Studie sollte zeigen, daß die Gelschicht-Technik auf zusammengesetzte Reaktionen angewendet werden kann. Enzyme, die sich direkt oder indirekt über Hilfsenzyme an eine NAD- oder NADP-abhängige Dehydrogenase koppeln lassen, können somit histochemisch über eine durch Phenazin-methosulfat vermittelte Reduktion eines Tetrazoliumsalzes nachgewiesen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Enzymreaktionen lassen sich in zwei Reaktionstypen gliedern: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase repräsentiert das "Indikatorenzym" im Fall der

Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexokinase und Glucose-phosphat-Isomerase. Triosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase und Aldolase werden direkt oder über Hilfsenzyme an die durch Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase in Anwesenheit von Arseniat katalysierte Reaktion gekoppelt.

Allein durch den Kontakt von Gewebeschnitten mit dem Gelfilm, der Substrate, Cosubstrate, Hilfsenzyme, Indikatorensym, Phenazinmethosulfat und das Tetrazoliumsals enthält, wird der histochemische Nachweis jedes der oben genannten Enzyme möglich. Die spezifische Reaktion läuft in der Grenzschicht zwischen Gewebeschnitt und Gelfilm ab. Das Reduktionsprodukt Formazan ist somit praktisch am Enzymort abgelagert. Die Struktur des Gels verhindert die Enzymdiffusion, so daß Artefakte durch Diffusion weitgehend ausgeschlossen sind. Das Enzymverteilungsmuster wird unter dem Mikroskop schon in wenigen Augenblicken sichtbar, nachdem der Gewebeschnitt mit dem Gelfilm in Kontakt gebracht worden ist. Nur bei längeren Inkubation des Gewebeschnittes mit dem Gelfilm kann eine Diffusion des Enzyms beobachtet werden (31,36,45). Diese Diffusion ist jedoch mehr oder weniger sekundär und verändert kaum das primäre Muster der Formazanablagerung. Derartige Diffusionsartefakte müßten zu einheitlichen und weniger zu spezifischen Farbablagerungsmustern führen. Daß außerdem diffusionsbedingte artefizielle Formazanablagerungen mit bestimmten histologischen Strukturen zusammenfallen könnten, ist kaum vorstellbar. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber nur Färbungen von definierten histologischen Strukturen.

Die Frage nach der intrazellulären Lokalisation der glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme läßt sich als eine Unterscheidung von zwei verschiedenen Verteilungstypen präzisieren. Die intrazelluläre Lokalisation der Hexokinase unterscheidet sich von der Lokalisation sämtlicher anderer Enzyme, die hier untersucht wurden. Das Färbemuster, das sich für die Hexokinase als typisch darstellt, gleicht dem der NAD-spezifischen Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8) und des Malic-Enzyme (EC 1.1.1.40), die beide mittels der Gelschicht-Technik im peri- und epimitochondrialen Raum des interfibrillären Sarkoplasmas lokalisiert wurden (13,45). Eine entsprechende Verteilung scheint auch für die Hexokinase charakteristisch zu sein. Weiterhin zeigt die Hexokinase große Ähnlichkeit in ihrem Färbeverhalten mit mitochondrialen Enzymen. Die Formazanablagerungen entsprechen augenscheinlich der Mitochondrienverteilung in den untersuchten Muskeln (14). Eine Anfärbung der Mitochondrien etwa durch einen Succinat-Dehydrogenase-Nachweis führt im Vergleich zu den Ergebnissen des Hexokinase-Nachweises zu identischen Bildern.

Die intensive Färbung der Mitochondrien bei der Hexokinase-Reaktion steht in gutem Einklang mit Ergebnissen, wonach eine beträchtliche Menge der gesamten zellulären Aktivität dieses Enzyms an die äußere Mitochondrienmembran gebunden ist (27,30, 49). Daneben findet sich bei der histochemischen Darstellung der Hexokinase auch eine merkliche Färbung im Bereich des Sarkolemm (Abb. 4). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einem höheren Aktivitätsniveau der Hexokinase an den Mitochon-

drien des subsarkolemmnalen Raumes. Es kann aber ebenso lösliche Hexokinase in einer höheren Konzentration im subsarkolemmnalen Sarkoplasma vorliegen. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Hexokinase an das Sarkolemm und das mit ihm in Verbindung stehende sarkotubuläre System gebunden ist. Jede dieser Interpretationen würde der physiologischen Rolle der Hexokinase als einem essentiellen Enzym, das Glucose in den Stoffwechsel der Zelle einschleust, gerecht werden.

Qualitativ gleiche Ergebnisse erbrachte die Hexokinase-Reaktion im *M. psoas*. In ihrer Intensität war die beobachtete Färbung jedoch wesentlich schwächer. Dieser Befund wird durch quantitative Hexokinasebestimmungen bestätigt. Das Aktivitätsniveau der Hexokinase steht in einem umgekehrten Verhältnis zu den Aktivitätsniveaus der anderen glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme, d.h. das Aktivitätsniveau der Hexokinase ist im roten Muskel höher als im weißen (16,42,43). In beiden Muskeltypen besteht jedoch eine konstante Relation zwischen der Aktivität der Hexokinase und dem Aktivitätsniveau der mitochondrialen Schlüsselenzyme des Citronensäurezyklus (42,43). Daraus leitet sich ab, daß das Aktivitätsniveau der Hexokinase proportional dem zellulären Gehalt an Mitochondrien in diesen Muskeln ist. Die Beobachtung paßt gut zu den von verschiedenen Autoren berichteten Bindung der Hexokinase an die Mitochondrien (27,30,49) und sie stützt die histochemischen Befunde, die im roten Muskel eine erheblich höhere Aktivität der Hexokinase zeigen als im weißen Muskel.

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase konnten im quergestreiften Muskel im Bereich der isotropen Zone lokalisiert werden (12,13,23,44). Für Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase ist eine entsprechende Lokalisation naheliegend. Sie wurde in allen Fällen durch eine deutliche Färbung definierter Sarkomerabschnitte bestätigt. Die in Längsschnitten beobachtete Färbung entspricht der Querstreifung der Muskelfasern. Zur Identifizierung der gefärbten Abschnitte der Sarkomere wurden polarisationsoptische Untersuchungen durchgeführt. Sie ergaben, daß die gefärbten Banden den isotropen Zonen der Myofibrillen entsprechen. Ein Beispiel gibt Abb. 10. Hier ist das Färbemuster

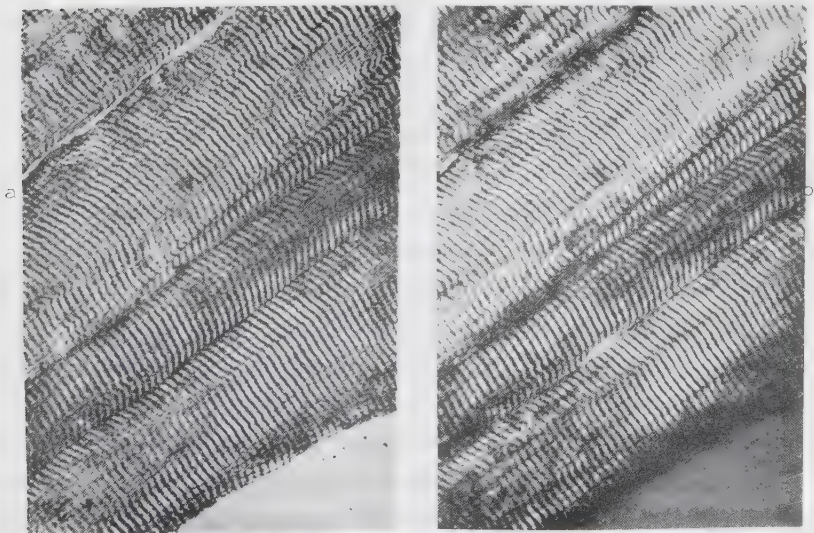


Abb. 10. Aldolase-Färbung im Längsschnitt der Muskeln.

- a) Aufnahme bei normalem Licht. Vergr.: 560 x
- b) Prismen gekreuzt, die anisotropen Zonen leuchten auf. Vergr.: 560 x

der Aldolase in einem Längsschnitt des M. psoas bei normalem und bei polarisiertem Licht photographiert. Bei gekreuzten Prismen bleiben die ungefärbten Banden hell, entsprechen also den anisotropen Zonen.

Aus den histochemischen Befunden zu entscheiden, ob die Färbung der isotropen Zone aus einer Enzymlokalisation innerhalb des interfilamentären Raumes oder aus der Lokalisation der glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme möglicherweise im transversalen sarkotubulären System resultiert, erscheint schwierig. Die letzere Lokalisationsform wurde von FAHIMI und AMARASINGHAM für die Lactat-Dehydrogenase und die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase vorgeschlagen (23,24). Auch in der vorliegenden Studie ergeben sich aus Färbungen am querschnittenen Muskel (Abb. 8) Hinweise auf eine mögliche Lokalisation der glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme im sarkoplasmatischen Retikulum. Zumindest kann die Verbindung glycolytischer Enzyme mit dem sarkoplasmatischen Retikulum aufgrund der Ergebnisse aus den spezifischen Nachweisreaktionen der Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase im querschnittenen Muskel nicht ausgeschlossen werden. Das Muster der Formazanablagerungen gleicht einem Netzwerk, das durchaus dem sarkoplasmatischen Retikulum aber ebenso auch einer Anfärbung des interfilamentären Sarkoplasmas der isotropen Tönen entsprechen könnte. Andererseits bestehen in verschiedenen Muskeln Unterschiede im jeweiligen Gehalt an sarkoplasmatischem Retikulum. In der Literatur werden Muskeln

ohne oder mit nur wenig sarkoplasmatischem Retikulum beschrieben, wie z.B. die longitudinale Rumpfmuskulatur von *Amphioxus* (39). Gerade diese Muskeln sind aber durch einen relativ hohen Gehalt an glycolytischen Enzymen charakterisiert (Groeschner und Pette, unveröffentlichte Befunde). Ferner konnte aus dem Vergleich verschiedener Insektenmuskeln ein umgekehrtes Verhältnis zwischen dem zellulären Anteil an sarkoplasmatischem Retikulum und dem Aktivitätsniveau der glycolytischen Enzyme festgestellt werden (56). Ein konstantes Verhältnis wurde dagegen in diesen Muskeln zwischen dem Gehalt an glycolytischen Enzymen und der jeweiligen Länge der Sarkomere gefunden. Diese Beobachtung wurde als indirekter Beweis für die Lokalisation der glycolytischen Enzyme am Ort des kontraktile Apparates gewertet (17,56).

Für eine Lokalisation der glycolytischen Enzyme innerhalb des interfilamentären Raumes der isotropen Zone sprechen noch andere Ergebnisse. Bestimmte glycolytische Enzyme können in hoher Konzentration an F-Aktin gebunden werden, während eine entsprechende Adsorption dieser Enzyme an das Stroma-Protein des Muskels nicht oder nur geringfügig zu beobachten ist (8, 9,10,43). Speziell Aldolase kann in Myofibrillen, deren glycolytische Enzyme vorher vollständig extrahiert wurden, nach Readsorption histochemisch wieder im Bereich der isotropen Zonen nachgewiesen werden (7). Aus den vorliegenden histochemischen und lichtmikroskopischen Ergebnissen kann weder die Lokalisation im sarkotubulären System noch im interfilamentären Sarkoplasma ausgeschlossen werden. Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Lokalisationsmöglichkeiten

liegt jenseits der Aussagekraft der histochemischen Methode. Doch gerade, weil die Lösung dieses Problems noch aussteht, lassen sich einige zusätzliche Überlegungen anschließen.

Der Raum, der im sarkotubulären System bzw. im interfilamentären Sarkoplasma zur Verfügung steht, kann als quantitativ vergleichbar betrachtet werden. Somit sind die glycolytischen und glycogenolytischen Enzyme in extrem hoher Konzentration in einem der beiden Kompartimente vorhanden. Es wurde errechnet, daß sich die Konzentration der glycolytischen Enzyme bei einer Lokalisation im interfilamentären Sarkoplasma auf mindestens 200 mg/ml belaufen würde (44). Dieser Wert würde auch für das sarkoplasmatische Retikulum gelten. Die hohe Konzentration der glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme in dem einen oder anderen Kompartiment läßt daran denken, daß diese Enzyme nicht in Lösung, sondern in einem gelförmigen Aggregatzustand vorliegen. Weitere Untersuchungen könnten vielleicht von der Hypothese ausgehen, daß die Struktur dieses Enzymprotein-Geles der Folge der katalysierten Reaktionen entspricht und somit einen labilen, aber geordneten Multienzymkomplex darstellt.

Zusammenfassung

Das Gelschicht-Verfahren wurde zum histochemischen Nachweis der Phosphorylase, Phosphoglucumutase, Hexokinase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase nach dem Prinzip des zusammengesetzten optischen Tests weiterentwickelt.

Die intrazelluläre Verteilung der untersuchten Enzyme wurde im weißen und roten Muskel des Kaninchens studiert. Die Ergebnisse der Aktivitätsnachweise waren für jedes einzelne Enzym in beiden Muskeltypen identisch. Allein die Farbtintensität war je nach der glycolytischen Potenz der Muskeln verschieden groß.

Beim Nachweis der Hexokinase wurden Färbemuster gefunden, wie sie eher für mitochondriale Enzyme typisch sind. Die Färbemuster sprechen für eine hohe Aktivität der Hexokinase im perimitochondrialen Raum und beweisen damit auch die von anderen Autoren in vitro nachgewiesene partielle Bindung der Hexokinase an die äußere mitochondriale Membran. Außerdem führte der histochemische Nachweis der Hexokinase zu einer ausgeprägten Anfärbung des Sarkolemm, was möglicherweise für eine hohe Enzymaktivität in diesem Bereich spricht. Völlig andere Färbemuster wurden bei den Nachweisen der übrigen glycogenolytischen und glycolytischen Enzyme gefunden. Einheitliches Merkmal ist im Falle der Phosphorylase, Phosphoglucumutase, Glucosephosphat-Isomerase, Phosphofructokinase, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase die Anfärbung der isotropen Zonen.

Diese Befunden weisen darauf hin, daß diese Enzyme im Bereich der Aktin-Filamente, d.h. im interfilamentären Sarkoplasma der isotropen Zonen lokalisiert sind. Für eine derartige Lokalisation spricht auch die kürzlich nachgewiesene reversible Bindung einiger Glycolyseenzyme an F-Aktin. Nach den vorliegenden Befunden ist damit die Verteilung der Enzyme von Glycogenolyse und Glycolyse im extramitochondrialen Cytoplasma der Muskelzelle keineswegs statistisch ungeordnet, sondern bestimmten sarkoplasmatischen Strukturen zugeordnet.

Literatur

1. Abe, T. and Shimizu, N.: Histochemical method for demonstrating aldolase. *Histochemie* 4: 209, 1964.
2. Amberson, W.R., Bauer, A.C., Philpott, D. E. and Roisen, F.: Proteins and enzyme activities of press juices, obtained by ultracentrifugation of white, red and heart muscles of the rabbit. *J. Cell.Comp.Physiol.* 63: 7, 1964.
3. Amberson, W.R., and Bauer, A.C.: Electrophoretic studies of muscle proteins. I. Complex formation between delta protein and f-actin. *J.Cell.Physiol.* 70: 91, 1967
4. Amberson, W.R., Roisen, F.J. and Bauer, A.C.: The attachment of glycolytic enzymes to muscle ultrastructure. *J.Cell.Comp. Physiol.* 66: 71, 1965.
5. Anderson, N.G. and Green, J.G.: The soluble phase of the cell. In *Enzyme Cytology*, edited by D.B. Roodyn. Academic Press, London, 1967, p. 475.
6. Arnold, F., Kunze, K.D. und Simon, H.: Zur Problematik des histochemischen Nachweises der Fructose-1.6-diphosphat-Aldolase am Beispiel der Rattenniere. *Histochemie* 9: 84, 1967.
7. Arnold, H., Nolte, J. and Pette, D.: Quantitative and histochemical studies on the desorption and re-adsorption of aldolase in cross-striated muscle. *J. Histochem. Cytochem.*, in press
8. Arnold, H. and Pette, D.: Binding of aldolase to structure proteins of the muscle. In *Abstracts of the Fifth Meeting of the Federation of European Biochemical Societies*, Praha, 1968, Abstract 772, Über die Bindung von Enzymen der Glycolyse an Strukturproteine des Muskels. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348: 1225, 1967.
9. Arnold, H. and Pette, D.: Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* 6: 163, 1968.

10. Bauer, A.C., Pette, D., Roisen, F. and Amberson, W.R.: Binding of aldolase by rabbit muscle ultrastructure. Fed. Proc. 23: 310, 1964.
11. Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1962.
12. Brandau, H. and Pette, D.: Lokalisation extramitochondrialer Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels im quergestreiften Muskel. Z. Klin. Chem. 3: 199, 1965.
13. Brandau, H. und Pette, D.: Topische Muster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im quergestreiften Muskel. Enzym. Biol. Clin. (Basel) 6: 123, 1966.
14. Bubenzer, H.J.: Die dünnen und die dicken Muskelfasern des Zwerchfells der Ratte. Z. Zellforsch. 69: 520, 1966.
15. Bücher, T., Luh, W. und Pette, D.: Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. In Handbuch für Physiologische Chemie, Vol. VI/1. Springer-Verlag, Berlin, 1964.
16. Burleigh, I. G. and Schimke, R.T.: On the activities of some enzymes concerned with glycolysis and glycogenolysis in extracts of rabbit skeletal muscles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 831, 1968.
17. Czok, R. and Bücher, T.: Crystallized enzymes from myogen of rabbit skeletal muscle. Advances Protein. Chem. 15: 315, 1960.
18. De Duve, C., Wattiaux, R. and Bandhuin, P.: Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. Advances Enzym. 24: 291, 1962.
19. Delbrück, A., Zebe, E. und Bücher, T.: Über Verteilungsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung. Biochem. Z. 331: 273, 1959.
20. Emmart, E.W., Spicer, S.S., Turner, W.A. and Henson, J.G.: The localization of glyveraldehyde-3-phosphate dehydrogenase within the muscle of the roach, periplaneta americana, by means of fluorescent antibody. Exp. Cell. Re. 26: 78, 1962.

21. Engel, W.K.: Cytological localization of glycogen in cultured skeletal muscles. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 38, 1961.
22. Eyer, P. und Pette, D.: Kinetische Mikrobestimmung von Nucleosid-Triphosphaten in der Glucose-1-Phosphat-Kinase/Phosphoglucomutase-Reaktion. *Enzym Biol. Cl.* (Basel) 8: 189, 1967.
23. Fahimi, H.D. and Amarasingham, C.R.: Cytochemical localization of lactic dehydrogenase in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 22: 29, 1964.
24. Fahimi, H.D. and Karnovsky, M.J.: Cytochemical localization of two glycolytic dehydrogenases in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 29: 113, 1966.
25. Farber, E., Sternberg, W.H. and Dunlap, C.E.: Histochemical localization of specific oxidative enzymes. I. Tetrazolium stains for DPN-diaphorase and TPN-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.* 4: 254, 1956.
26. Guerritore, A., Pette, D. e Bücher, T.: Estrazione e purificazione della fosfofruttocinasi di muscolo. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 38: 1763, 1962.
27. Hernandez, A. and Crane, R.K.: Association of heart hexokinase with subcellular structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 113: 223, 1966.
28. Hess, R., Scarpelli, D.G. and Pearse, A.G.E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes, II. Pyridine nucleotide linked dehydrogenase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 753, 1958.
29. Hofer, H.W. und Pette, D.: Verfahren einer standardisierten Extraktion und Reinigung der Phosphofructokinase aus Kaninchen-Skelettmuskel. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349: 995, 1968.
30. Karpatkin, S.: Soluble and particulate hexokinase of frog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242: 3525, 1967.
31. Lehrer, G.M., Silides, D. and Farmer, M.F.: Pyridine nucleotide dependent dehydrogenases: a comparison of quantitative and slide histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 13: 700, 1965.

32. Leloir, L.F. and Goldemberg, S.H.: Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. *J. Biol. Chem.* 235: 919, 1960.
33. Lowry, O.H. and Passonneau, J.V.: Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241: 2268, 1966.
34. Margreth, A., Catani, C. and Schiaffino, S.: Isolation of microsome-bound phosphofructokinase from frog skeletal muscle and its inhibition by calcium ions. *Biochem. J.* 102: 35 c, 1967.
35. Margreth, A., Muscatello, U. and Andersson-Cedergren, E.: A morphological and biochemical study on the regulation of carbohydrate metabolism in the muscle cell. *Exp. Cell Res.* 32: 484, 1963.
36. McMillan, P.J.: Differential demonstration of muscle and heart type lactic dehydrogenase of rat muscle and kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 15: 21, 1967.
37. Opie, L.H. and Newsholm, E.A.: The activity of fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem. J.* 103: 391, 1967.
38. Passonneau, J.V. and Lowry, O.H.: P-fructokinase and the control of the citric acid cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13: 372, 1963.
39. Peachey, L.D.: Structure of the longitudinal body muscles of amphioxus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10, suppl. 159, 1961.
40. Pearse, A.G.E. and Scarpelli, D.G.: Intramitochondrial localization of oxidative enzyme systems. *Exp. Cell Res.*, suppl. 7, 50, 1959.
41. Pette, D.: Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel. *Naturwissenschaften* 52: 597, 1965.
42. Pette, D.: Energieliefernder Stoffwechsel des Muskels unter zellphysiologischem Aspekt. In Symposium über progressive Muskeldystrophie, edited by E. Kuhn. Springer Verlag, Berlin, 1966, p. 492.

43. Pette, D. Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels. In Praktische Enzymologie edited by F. W. Schmidt. Huber Verlag, Bern, 1968, p.15.
44. Pette, D. and Brandau, H.: Intracellular localization of glycolytic enzymes in cross-striated muscles of locusta migratoria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9: 367, 1962.
45. Pette, D. und Brandau, H.: Enzym-Histogramme und Enzymaktivitätsmuster der Rattenleber. Nachweis Pyridinnukleotidspezifischer Dehydrogenasen im Gelschicht-Verfahren. Enzym. Biol. Clin. (Basel) 6: 79, 1966.
46. Pette, D. und Bücher, T.: Proportionskonstante Gruppen in Beziehung zur Differenzierung der Enzymaktivitätsmuster von Skelettmuskeln des Kaninchens. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 331: 180, 1963.
47. Pette, D. and Hofer, H.W.: Some properties of fructose-6-phosphate kinase from rabbit skeletal muscle. In Control of Energy Metabolism, edited by B. Chance, R. W. Estabrook and J. R. Williamson. Academic Press, New York, 1965, p. 71.
48. Pette, D., Vogell, W. and Brandau, H.: Compartmentation of cross-striated muscle with respect to extramitochondrial enzymes of energy-producing metabolism. Paper presented at Fifth International Congress on Electron Microscopy, Philadelphia, 1962
49. Rose, I. A. and Warms, J.V.B.: Mitochondrial hexokinase. J.Biol.Chem. 242: 1635, 1967
50. Siess, M. und Pette, D.: Die Lokalisation des Glycogens in quergestreifter Muskulatur von locusta migratoria. Biochem. Z. 332: 495, 1960.
51. Simon, H. Arnold, F. und Rindfleisch, B.: Indirekter Aldolasenachweis. Acta Histochem. (Jena) 23: 322, 1966.
52. Starlinger, H.: Über die Bindung der Muskelaldolase an grob-disperse Partikel in Homogenaten erregter Muskeln. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348: 864, 1967.

53. Takeuchi, T. and Kuriaki, H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 3: 153, 1954.
54. Viale, G.L.: Über den histochemischen Nachweis der F-1.6-DP-Aldolase. *Naturwissenschaften* 51: 438, 1964.
55. Vinuela, E., Salas, M.L. and Sols, A.: Endproduct inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12: 140, 1963.
56. Vogell, W. Bishai, F.R., Bücher, T., Klingenberg, M., Pette, D. und Zebe, E.: Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln von *locusta migratoria*. *Biochem. Z.* 332: 81, 1959.
57. Wijke, M. van, Blanchaer, M.C. and Jacyk, W.R.: The oxidation of lactate and α -glycerophosphate by red and white skeletal muscle: II. Histochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.* 11: 505, 1963.

Es ist mir ein großes Anliegen, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Dirk Pette für die Überlassung des Themas herzlich zu danken. Mit nie versiegender Liebenswürdigkeit und stets bereitwilligst gewährter Unterstützung half er mir, diese Arbeit zum Abschluß zu bringen. Die Zeit, die ich unter seiner Führung arbeiten durfte, wird immer eine kostbare Erinnerung an meine Studienzeit bleiben.

Lebenslauf

Am 24. November 1939 wurde ich, Peter Sigel, als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Reinhold Sigel und dessen Ehefrau Elsa, geb. Peter, in München geboren. Im September 1945 trat ich in die Volksschule an der Flurstraße in München ein. Ab Herbst 1949 besuchte ich das Wilhelms-Gymnasium in München. Dort legte ich im Juni 1958 die Reifeprüfung ab. Von 1958 bis 1962 studierte ich dann an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Mathematik und Physik. Im Winterhalbjahr 1963 begann ich ebenfalls an der Universität in München das Studium der Zahnheilkunde. Nach Abschluß des zahnärztlichen Staatsexamens am 23. Mai 1969 erhielt ich durch das Bayerische Staatsministerium des Innern am 6. Juni 1969 die Bestallung als Zahnarzt.

